

Protein-charged microparticles preparation, useful in e.g. diagnostic assays, comprises heating suspension of microparticles and protein material, then irradiating with ultraviolet light

Patent number: DE19924643
Publication date: 2000-11-30
Inventor: KLEEKAMM CLAUS-DIETER (DE); SCHMID FRANZ (DE)
Applicant: ROCHE DIAGNOSTICS GMBH (DE)
Classification:
- **international:** A61K9/14
- **european:** A61K9/16K2
Application number: DE19991024643 19990528
Priority number(s): DE19991024643 19990528

Abstract of DE19924643

Preparation of protein-charged microparticles involves: (a) contacting microparticles with protein material in a suspension; (b) heating the suspension uniformly to 25-70 deg C over 10-90 minutes; (c) maintaining the temperature attained in step (b) for 0-50 hours; and (d) irradiating the suspension with ultraviolet light in the absence of a photolinker. Independent claims are included for: (1) protein-charged microparticles obtained by the process; and (2) a modular apparatus for carrying out the process, comprising the following modules, connected by lines: (a) a charging reactor, provided with a heating mantle and a stirrer; and (b) an irradiation module, consisting of a outer tube permeable to UV light and an unconnected, free-floating internal body of smaller diameter, such that the particle suspension passes through the space between the outer tube and inner body, the outer tube being surrounded by a UV source.

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 199 24 643 A 1**

⑤① Int. Cl.⁷:
A 61 K 9/14

②① Aktenzeichen: 199 24 643.2
②② Anmeldetag: 28. 5. 1999
②③ Offenlegungstag: 30. 11. 2000

DE 199 24 643 A 1

⑦① Anmelder:
Roche Diagnostics GmbH, 68305 Mannheim, DE

⑦④ Vertreter:
Weickmann & Weickmann, 81679 München

⑦② Erfinder:
Schmid, Franz, 86911 Dießen, DE; Kleekamm,
Claus-Dieter, Dr., 82152 Krailling, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

- ⑤④ Verfahren zur Herstellung von Protein-beladenen Mikropartikeln sowie die dazu verwendete Vorrichtung
- ⑤⑦ Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Protein-beladenen Mikropartikeln durch Wärmebehandlung einer das Proteinmaterial enthaltenden Suspension, wobei die Suspension so erwärmt wird, daß die Temperatur innerhalb von 10 bis 90 Minuten gleichmäßig auf 25 bis 70° C gesteigert wird, dann die Temperatur über einen Zeitraum von 0 bis 50 Stunden aufrechterhalten wird und die Suspension in Abwesenheit von Photolinkern mit UV-Licht bestrahlt wird. Außerdem betrifft die Erfindung eine für ein derartiges Verfahren verwendete Vorrichtung und derartige Protein-beladene Mikropartikel.

DE 199 24 643 A 1

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Protein-beladenen Mikropartikeln durch Wärmebehandlung der Protein-beladenen Mikropartikel in Suspension. Weiterhin betrifft die Erfindung eine Vorrichtung zur Durchführung dieses Verfahrens und die mit diesem Verfahren herstellbaren Mikropartikel.

Protein-beladene Mikropartikel (auch "Beads" genannt) sind bekannt und werden vielfach in medizinischen, immunologischen und diagnostischen Nachweisverfahren als Testphase verwendet. Die unbeladenen Ausgangspartikel bestehen vorwiegend aus Latex, beispielsweise Polystyrol-Latex, und sind oft durch einen Anteil an Magnetit magnetisierbar. Die Kopplung von Protein an die Latexpartikel erfolgt bekanntermaßen in der Regel durch chemische Linker (kovalente Bindung) oder durch Adsorption (nicht kovalente Bindung), die thermisch durchgeführt werden kann.

Die im Stand der Technik beschriebenen kovalenten Kopplungsverfahren gehen von verschiedenen, funktionelle Gruppen (-COOH, -Tosyl, etc.) aufweisenden Mikropartikeln (funktionalisierte Partikel) aus und nutzen diese Funktionen zur Ausbildung der kovalenten Bindungen mit den Proteinen.

Kovalente Kopplungsverfahren unterscheiden sich von adsorptiven Kopplungsverfahren dadurch, daß die bei erstem verwendeten funktionalisierten Partikel deutlich hydrophiliere Oberflächen besitzen als nicht funktionalisierte Partikel. Dadurch wird der Anteil an adsorptiv gebundenen, Blutung verursachenden Proteinmoleküle reduziert. "Blutung" bedeutet, daß sich nicht oder schwach gebundenes Protein wieder ablöst. Dauerhaft wird nur Protein gebunden, welches mit den funktionellen Gruppen auf der Partikeloberfläche kovalent reagiert hat. Allerdings weisen die Ausgangspartikel eine hohe Chargenvarianz und geringe Lagerstabilität der funktionellen Gruppen auf der Oberfläche auf, was nach der Beladung zu niedrigen und/oder stark schwankenden Ergebnissen führt. Daher war eine großtechnische Herstellung bisher nicht möglich. Der Grund ist, daß die auf der Oberfläche vorhandene Anzahl der zugänglichen funktionellen Gruppen (Chargenabhängigkeit) und die Größe (räumliche Ausdehnung) des zu koppelnden Proteins limitierend sind. Daraus ergibt sich der zusätzliche Nachteil geringer Bindekapazität bei kovalenten Kopplungsverfahren.

Giese offenbart in US 4,478,914 und US 4,656,252 Kopplungsverfahren, durch die eine mehrschichtige Beladung (Multi-layer) von Oberflächen mit funktionellem Protein erreicht wird. Hierbei wurde Biotin kovalent an die Oberfläche gebunden und anschließend wiederholt Avidin und ein Biotin-gekoppelter Extender an das zu beladene Material gebunden, wobei ungebundene Substanz jeweils durch Waschen entfernt wurde. Bei einem solchen Mehrschicht-Verfahren kann es durch verzögerte Desorption zu einer verspäteten Blutung kommen.

Bei herkömmlichen Waschschritten werden die beladenen Teilchen durch Zentrifugieren oder magnetische Abtrennung pelletiert und resuspendiert, was ebenfalls zu einer Reduktion der Stabilität der beladenden Mikropartikel führt.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es demnach, ein Verfahren bereitzustellen, mit dem die großtechnische Herstellung von Proteinbeladenen Mikropartikeln ermöglicht wird, wobei vor allem chargenunabhängige, gleichbleibende Produktqualität Ziel der Erfindung ist. Die dazu verwendete Vorrichtung ist ebenfalls Teil der Erfindung. Weiterhin beabsichtigt die Erfindung, Protein-beladene Mikropartikel bereitzustellen, die durch dieses Verfahren erhältlich sind und eine hohe Bindekapazität bei gleichzeitig geringer Blutung sowie hohe Lagerfähigkeit aufweisen.

Gemäß einer Ausführungsform der Erfindung wird diese Aufgabe durch ein Verfahren zur Herstellung von Protein-beladenen Mikropartikeln durch Wärmebehandlung einer das Proteinmaterial enthaltenden Suspension gelöst, umfassend die Schritte (a) Inkontaktbringen von Mikropartikeln mit Proteinmaterial in einer Suspension, (b) gleichmäßiges Erwärmen der Suspension auf eine Temperatur von 25 bis 70°C über einen Zeitraum von 10 bis 90 min. (c) Aufrechterhalten der in (b) erreichten Temperatur über einen Zeitraum von 0 bis 50 h, (d) Bestrahlen der Suspension mit UV-Licht in Abwesenheit eines Photolinkers.

Die zu beladenen Mikropartikel oder Beads, die für das Verfahren der vorliegenden Erfindung verwendet werden können, sind mikrodispers und werden in Suspensionen mit Konzentrationen von unter 20%, bevorzugt unter 10% Gewicht pro Volumen verwendet, wobei ein Bereich von 0,1 bis 10% Gew./Vol. insbesondere von 0,2 bis 2% Gew./Vol. bevorzugt ist. Im Gegensatz zu bei kovalenten Verfahren benötigten funktionalisierten Partikeln, werden für das Verfahren der vorliegenden Erfindung nicht funktionalisierte Partikel als Ausgangsmaterial verwendet, die sich in wäßriger Phase hydrophob verhalten, d. h. sie weisen keine hydrophilen Funktionen auf der Oberfläche auf, welche die Hydrophobität merklich herabsetzen können. Sie können aus Latex und ähnlichen Materialien bestehen, bevorzugt aus Polystyrol-Latex und gegebenenfalls magnetisierbares Material wie etwa Magnetit enthalten. Die Partikelgröße der unbeladenen Teilchen liegt bevorzugt im Bereich von 50 nm bis 25 µm. Im Falle von Magnetpartikeln liegt die bevorzugte Größe im Bereich von 0,5 µm bis 25 µm, da in diesem Bereich die Magnetseparation günstig funktioniert. Geeignet sind beispielsweise Dynabeads der Firma Dynal mit einer Größe von 2,8 µm, bestehend aus 88% Polystyrol und 12% Magnetit oder magnetische und nichtmagnetische Partikel der Marke Estapor der Firma Merck.

Das auf die Partikel zu bindende, bevorzugt polymerisierte Proteinmaterial besitzt bevorzugt ebenfalls eine hydrophobe Oberfläche und hat eine Größe von mindestens 20 nm bis 300 nm, bestimmt durch Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS), wobei ein Größenbereich von 50 nm bis 200 nm bevorzugt ist. Bevorzugte Größenkorrelationen zwischen Partikel und polymerisiertem Protein liegen im Bereich von > 10 : 1, bevorzugt > 15 : 1 und besonders bevorzugt > 20 : 1 (Partikeldurchmesser : Proteindurchmesser). Für die vorliegende Erfindung besonders geeignete Materialien sind hochmolekulare Proteine oder polymerisierte Proteine, wie etwa polymerisiertes Streptavidin (SA-Poly). Es wurde gefunden, daß polymerisierte Proteine stärker auf Oberflächen adsorbieren. Der Grund ist wahrscheinlich, daß polymerisierte Proteine eine größere Anzahl an Kontaktstellen aufweisen. Somit wäre immer noch eine ausreichende Bindung an die Oberfläche gewährleistet, auch wenn sich einzelne Kontaktstellen lösen. Bei Monomeren mit wenigen bis einer einzigen Kontaktstelle löst sich das ganze Monomer ab, sobald sich die Kontaktstelle löst. Polymerisierung kann in bekannter Weise bei Streptavidin durch chemische Behandlung erreicht werden. Ebenfalls besonders geeignet sind polymerisierte Antikörper.

Die Blutungsneigung wird in Nanogramm (Biotin-bindlefähiges SA-Monoäquivalent) pro Milligramm (Mikropartikel) angegeben. Das heißt, daß abgeblutetes (Biotin-bindlefähiges) SA-Poly mittels einer SA-Mono-Eichkurve bestimmt wird ("Sandwich-Test" mit Biotin-Tube und Biotin-POD). Hier liegen die Werte bei Raumtemperatur bevorzugt bei < 250 ng/mg, stärker bevorzugt bei < 100 ng/mg, noch stärker bevorzugt bei < 80 ng/mg und am meisten bevorzugt bei < 40 ng/mg. Nach Methoden des Stands der Technik werden Blutungen von ca. 400 ng/mg erreicht.

Das Inkontaktbringen der Mikropartikelsuspension mit dem hochmolekularen Proteinmaterial im Verfahren der vorliegenden Erfindung erfolgt bevorzugt bei Normaltemperatur (normalerweise Raumtemperatur, ca. 20 bis 23°C), d. h. das Proteinmaterial wird nicht vortemperiert. Während des Inkontaktbringens, bevor mit der Erwärmung begonnen wird, erfolgt im allgemeinen bereits eine adsorptive Beladung der Mikropartikel mit dem Proteinmaterial. Die anschließende Erwärmung muß nicht sofort erfolgen, sondern kann mit beliebiger Verzögerung vorgenommen werden. Bevorzugt beträgt der Zeitraum vor dem Temperaturanstieg 1 bis 60 Minuten. Die Temperatur wird dann gleichmäßig innerhalb von 10 bis 90, bevorzugt 10 bis 60 Minuten auf eine Temperatur von 25°C bis 70°C, bevorzugt 35 bis 65°C erhöht. Theoretisch kann bis auf eine Temperatur erhitzt werden, bei der die Proteine ihre Funktion einbüßen. Die so erreichte Beladungstemperatur von 25°C bis 70°C wird dann für einen für die gewünschte Beladung ausreichend langen Zeitraum aufrechterhalten. Dieser kann von 0 bis 50, bevorzugt bis 20 Stunden betragen. Besonders bevorzugt beträgt er von 1 bis 20 Stunden.

Es wird angenommen, daß hierbei die innerhalb der ersten Minuten bereits an der Oberfläche angelagerten Proteinpartikel weiteren Veränderungen unterliegen, die einer Art Weiterpolymerisation oder Weitervernetzung entsprechen, wobei weitere Hydrophobisierung erreicht wird. Wird nämlich die Erwärmung von polymerem Streptavidin (SA-Poly) vor der Beladung durchgeführt, so wird keine signifikante Beladung erreicht. Die oben beschriebene Temperaturführung hat auch den Vorteil, daß auf diese Weise die Beladungsmenge gesteuert werden kann. Entscheidend ist hierbei die Temperaturanstiegskurve. Die für eine gewünschte Beladung nötige Temperaturkurve kann durch den Fachmann empirisch ermittelt werden. Für die beschriebenen Bindekapazitäten/Blutungsneigungen erwies sich z. B. ein Temperaturanstieg von von 10 bis 90 Minuten bei 25 bis 70°C als besonders geeignet. Dabei liegt der Temperaturanstieg bei 0,03°C/min bis 5°C/min, bevorzugt 0,5°C/min bis 2°C/min. Vor der UV-Bestrahlung oder/und der Abtrennung von nicht gebundenem Proteinmaterial kann die Suspension wieder auf eine niedrigere Temperatur als die bei der Beladung verwendete abgekühlt werden.

Nach der Beladung und der Wärmebehandlung können bevorzugt bereits ein erster oder mehrere erste Abtrennschritt(e) folgen, die dazu dienen, schwach oder nicht adsorbiertes Protein zu entfernen. Dies kann von Vorteil sein, da bei der anschließenden UV-Fixierung ungebundenes Protein verändert wird und eine mögliche weitere Quervernetzung zu größeren Strukturen führen kann, welche das Abtrennen von den Mikropartikeln erschweren. Wesentlich ist jedoch eine Abtrennung des nicht gebundenen Proteins nach der weiter unten näher beschriebenen UV-Licht-Fixierung. Die folgende Erläuterung der Abtrennung gilt daher sowohl wenn nur nach der UV-Fixierung als auch wenn vor derselben abgetrennt wird.

Die Abtrennung kann durch herkömmliche Verfahren, wie beispielsweise magnetische Trennung im Falle von Magnetit enthaltenden Mikropartikeln, durchgeführt werden. Bevorzugt ist für das Verfahren der vorliegenden Erfindung eine Abtrennung in einer Mikrofiltrationseinheit durch Siebe, Filter oder Membranen. Diese können sowohl hydrophil als auch hydrophob sein, es ist jedoch im letzteren Fall bevorzugt, sie vor dem Einsatz in einen hydrophilen Zustand zu überführen, was auf herkömmlich Art und Weise geschehen kann. Sie weisen bevorzugt eine Porengröße auf, welche zwischen der Größe der Mikropartikel und der Größe des hochmolekularen Proteinmaterials liegt. Besonders geeignete Porengrößen liegen im Bereich von etwa

50% über der Größe des abzutrennenden Proteins, d. h. ca. 50 nm bis 2,5 µm. Membranen mit Porengrößen von 0,4 µm, bevorzugt 0,45 µm bis 2,5 µm, bevorzugt bis 2 µm sind besonders geeignet.

Die Abtrennung kann einmal oder mehrmals durchgeführt werden, wobei ein Puffer oder ein Puffersystem, bestehend aus unterschiedlichen Puffern, verwendet werden kann. Die Puffer enthalten bevorzugt Salze und waschaktive Substanzen zur Verdrängung/Solubilisierung nicht- oder schwachgebundener Proteine sowie sogenannte "blocking agents" (z. B. Serumalbumin) zum Auffüllen noch freier Partikeloberfläche. Bevorzugt wird der Abtrennschritt mehrmals, vorzugsweise dreimal, mit unterschiedlichen Puffern durchgeführt, die sich jeweils im Salz- und Detergenzgehalt voneinander unterscheiden. Die Abtrennung erfolgt unter einem Volumenaustausch von dem 5- bis 15-fachen des Ansatzvolumens. Wichtig für die Effektivität der Abtrennung ist sowohl die Abtrennzeit (Zeitspanne, in der die Partikel in einer bestimmten Pufferlösung suspendiert sind) als auch der Fluss und Druck und deren Kombination im Abtrennsystem. Fluß und Druck sind abhängig von der jeweils verwendeten Anlage und könne vom Fachmann ermittelt werden. Abgetrennter Puffer kann durch Messung der Füllstandshöhe festgestellt und entsprechend durch frischen Puffer ersetzt werden.

Nach der thermischen Adsorption und gegebenenfalls Abtrennschritten wird das an die Oberfläche der Mikropartikel adsorbierte Protein durch UV-Bestrahlung fixiert. Diese Fixierung setzt die spätere Blutungsneigung deutlich herab. Der Grund ist vermutlich eine weitere, durch das UV-Licht hervorgerufene unspezifische Vernetzung der auf der Oberfläche der Mikropartikel adsorbierten Proteine. Die verwendete Wellenlänge des UV-Lichts liegt im Bereich von 220 bis 460 nm und beträgt für SA-Poly bevorzugt 300 bis 420 nm stärker bevorzugt mindestens 340 nm. Wichtig ist hierbei, daß die Wellenlänge so gewählt wird, daß unerwünschte Veränderungen des Proteins vermieden werden, wie etwa solche, die das Bindungsvermögen des Proteins beeinträchtigen. Sie kann durch einfache Vorversuche vom Fachmann leicht optimiert werden. Es hat sich überraschenderweise gezeigt, daß bessere Ergebnisse bei der Beladung erzielt werden, wenn dabei kein Photolinker verwendet wird.

Als nächster Verfahrensschritt erfolgt bevorzugt nach der UV-Bestrahlung die ggf. zweite Abtrennung des nicht fest an die Oberfläche der Partikel gebundenen Proteins durch das oben bereits beschriebene Verfahren. Es können natürlich auch zwei Abtrennungen (mit jeweils 1 bis 5 Schritten) jeweils vor und nach der Bestrahlung erfolgen.

Es wird bevorzugt während des gesamten Verfahrens darauf geachtet, daß eine Sedimentation der Mikropartikel verhindert wird. Besonders vorteilhaft ist es, zudem eine Sedimentation während der Abtrennung zu vermeiden. Zu diesem Zweck muss die Suspension in geeigneter Weise bewegt werden, was beispielsweise durch Rühren, Umpumpen, Einleitung von Dispergierenergie oder jedwede Kombination solcher Maßnahmen oder durch andere geeignete physikalische Methoden erreicht werden kann.

Die Abfüllung der beladenen Partikel erfolgt ebenfalls auf bevorzugt sterile Art und Weise in einem dafür vorgesehenen Abfüllmodul.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Vorrichtung zur Durchführung des obigen Verfahrens.

Eine solche Vorrichtung ist bevorzugt in Modulbauweise angelegt, wobei die Module durch Leitungen miteinander verknüpft sind, durch welche die Mikropartikelsuspension von einem Modul oder Gefäß in ein anderes gelangen kann. Die wichtigsten Module sind ein Beladereaktor, ein Belich-

tungsmodul, ein Abtrennmodul und ein Abfüllmodul, sowie Vorratsgefäße für Pufferlösungen. Eine erfindungsgemäße Vorrichtung zur Beladung von Mikropartikeln ist in der Lage, bei normalem Betrieb eine Sedimentation der Mikropartikel weitgehend zu verhindern. Dazu dient bevorzugt eine Pumpe, die einzelnen Module können jedoch auch mit Rührvorrichtungen versehen sein. Durch die Modulbauweise ist es möglich, auch während des Betriebes einzelne Module zu sterilisieren, indem sie durch Ventile in den Leitungen vom Fluß durch die übrigen Komponenten der Anlage abgetrennt werden.

Zum Betrieb werden zunächst die Mikropartikel in den Beladereaktor gefüllt, wobei Puffer aus einem der Vorlagegefäße zugegeben werden kann. Als nächstes erfolgt die Proteinzugabe, was bereits unter sterilen Bedingungen geschehen kann. Anschließend wird dann die Temperatur des Reaktorinhalts erhöht, um die Beladung zu erreichen. Für die Abtrennung nicht oder schwach adsorbierten Proteins wird der Inhalt des Reaktors in die Mikrofiltrationseinheit (Abtrennmodul) weitergepumpt. Diese kann z. B. aus einem Hohlfilter bestehen, der ein rohrförmiges Filterelement enthält, welches von der Suspension durchströmt wird. Das Filterelement enthält die oben genannten Membranen, welche vorzugsweise aus Keramik und/oder Polypropylen bestehen. Jedoch eignen sich auch andere Filtermaterialien, die eine hydrophile Oberfläche und geeignete Porendurchmesser zwischen der Proteingröße und dem Partikeldurchmesser aufweisen. Bevorzugt ist ein mehrmaliger Durchlauf der Mikrofiltrationseinheit vorgesehen, wobei die Suspension in einem Kreislauf über den Reaktor wieder in die Filtrationseinheit gepumpt wird. Auf diese Weise können verschiedene Puffer eingesetzt werden, die jeweils von den Vorlagegefäßen in den Reaktor eingeleitet werden. Abgetrennter Puffer kann dabei durch Messung der Füllstandshöhe im Reaktor festgestellt und entsprechend im Reaktor durch frischen Puffer ersetzt werden.

Nach der Abtrennung oder auch vor einer ersten Abtrennung des ungebundenen Proteins wird die Suspension in das Belichtungsmodul gepumpt, wo sie unter den oben beschriebenen Bedingungen mit UV-Licht bestrahlt wird. Hierbei besteht das Problem, daß es sich um konzentrierte und daher häufig trübe Suspensionen handelt, die nur begrenzt für UV-Licht durchlässig sind. Um diese Schwierigkeit auszuschalten, werden extrem dünne Schichten der Suspension bestrahlt. Dies wird vorzugsweise dadurch erreicht, daß man einen äußeren UV-Licht-durchlässigen Hohlkörper, z. B. ein Quarzglasrohr verwendet, in welchem sich ein rohrförmiger, geschlossener Körper mit einem Durchmesser befindet, der mit dem UV-durchlässigen Rohr einen rohrförmigen Spalt von etwa 0,5 bis 10 mm Dicke bildet. Der innere Körper ist vorzugsweise nicht befestigt, sondern wird freischwimmend gehalten. Dabei kann der Fluss durch die Einheit so geregelt werden, daß der innere Schwimmer tatsächlich immer schwebend vorliegt. Diese Ausführungsform hat den Vorteil, daß der Schwimmer einzeln durch Erhitzen sterilisierbar ist.

Besonders bevorzugt ist der Schwimmerkörper in der Lage, UV-Licht zu reflektieren, z. B. durch eine polierte Oberfläche. Besonders bevorzugt wird daher als Material für den Schwimmer polierter Edelstahl verwendet. Beispielsweise kann der Schwimmer einen Durchmesser von 75 mm aufweisen und zum Quarzrohr einen Spaltabstand von 2 mm aufweisen, durch den die zu bestrahlende Suspension strömt.

Die UV-Lichtquelle ist um das Quarzrohr herum angebracht. Sie kann z. B. ein aus mehreren (z. B. sechs) Lichtrohren bestehender Käfig sein, wobei die Wellenlänge durch einen folienförmigen Filter geregelt wird, der um das Quarz-

rohr gewickelt wird. Ein weiterer Vorteil dieses Moduls ist, daß das Totvolumen äußerst gering gehalten wird. Die Totvolumina der Leitungen, welche die verschiedenen Einheiten miteinander verbinden, sind zweckmäßig so gewählt, daß ein Rückspülen einer Einheit möglich ist, ohne daß dadurch die anfangs angegebenen Konzentrationsgrenzen unter- bzw. überschritten werden.

Weiterhin weist die Vorrichtung ein Abfüllmodul auf, durch das die fertigen beladenen Mikropartikel steril abgefüllt werden können.

Die gesamte Vorrichtung stellt ein geschlossenes System dar und kann unter sterilen Bedingungen im Dauerbetrieb gehalten werden, da alle Module durch die erfindungsgemäße Anordnung einzeln sterilisierbar sind. Sie ist gleichermaßen für Dauer- oder Batch-Betrieb geeignet.

Figurenbeschreibung

Fig. 1 zeigt eine schematische Darstellung einer Bead-Coating-Anlage mit den einzelnen Modulen, die durch Leitungen verbunden sind.

Fig. 2 zeigt ein schematische Darstellung des Belichtungsmoduls.

Eine spezielle Ausführungsform der Vorrichtung ist in den Fig. 1 und 2 dargestellt. Sie besteht aus verschiedenen Anlagekomponenten (Modulen). Fig. 1 zeigt als Einzelkomponenten einen heizbaren Beladereaktor 1, ein Belichtungsmodul 2, ein Abtrennmodul 3 und ein Abfüllmodul 4. Außerdem sind drei Vorlagegefäße 5, 6 und 7 dargestellt, welche als Vorratsgefäße für Puffer dienen. Alle Module und die Vorlagegefäße sind mit Leitungen 8 miteinander verbunden, welche mit Ventilen versehen sind. Desweiteren enthält diese bevorzugte Ausführungsform der Bead-Coating-Anlage eine Pumpe 9, welche den gewünschten Fluß durch die einzelnen Module gewährleistet. Die zentrale Einheit ist ein mit einer Rührvorrichtung 10 versehener Beladereaktor 1 mit Heizmantel 11, in den die Partikel eingebracht werden. Zusätzlich kann aus einem der Vorlagegefäße 5, 6 oder 7 Puffer in den Beladereaktor geleitet werden, um die Partikel weiter zu suspendieren. Da die verwendbaren Mikropartikel meist nicht in sterilem Zustand erhältlich sind, kann anschließend eine Sterilisation mittels Erwärmung durch den Heizmantel 11 erfolgen. Nach der Sterilisation wird der Reaktor wieder auf die Ausgangstemperatur abgekühlt, und es erfolgt, falls nötig eine Umpufferung der Mikropartikel in den sogenannten Beladepuffer (enthaltend 40 bis 60 mM Kaliumphosphat) aus einem der Vorlagegefäße 5, 6 oder 7, welcher die Lösung, in der die Partikel suspendiert sind, ersetzt. Die Anordnung der Leitungen 8 macht deutlich, daß die Mikropartikelsuspension aus dem Beladereaktor direkt in das Belichtungsmodul 2 oder auch erst in das Abtrennmodul 3 geleitet werden kann. Somit sind auch mehrere Durchläufe der einzelnen Module möglich.

Das Belichtungsmodul 2 ist detaillierter in Fig. 2 dargestellt. Die Pfeile zeigen den Fluß der Mikropartikelsuspension durch das Modul an. Zu sehen ist das äußere Rohr 12, der innere Körper 13, welcher nicht befestigt ist, sondern freischwimmend vorliegen kann, sowie die UV-Lichtquelle 14. Diese bestrahlt die Flüssigkeit im Zwischenraum 15.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Protein-beladene Mikropartikel, die durch das obige Verfahren unter Verwendung der dazugehörigen Vorrichtung erhalten werden können und die sich dadurch auszeichnen, daß sie eine geringere Blutungsneigung aufweisen als herkömmliche, mit Hilfe von bekannten adsorptiven Kopplungsverfahren hergestellte Proteinbeladene Mikropartikel. Bevorzugt wird als Proteinmaterial SA-Poly verwendet. Die Blutungsneigung wird in Nanogramm (Biotin-bindefähiges SA-Monoä-

quivalent) pro Milligramm (Mikropartikel) angegeben. Das heißt, daß abgeblutetes (Biotin-bindefähiges) SA-Poly mittels einer SA-Mono-Eichkurve bestimmt wird ("Sandwich-Test" mit Biotin-Tube und Biotin-POD). Hier liegen die Werte bei Raumtemperatur bevorzugt bei < 250 ng/mg, stärker bevorzugt bei < 100 ng/mg, noch stärker bevorzugt bei < 80 ng/mg und am meisten bevorzugt bei < 40 ng/mg. Nach Methoden des Stands der Technik werden Blutungen von ca. 400 ng/mg erreicht. Nach Modellbelastung (3 Wochen, 35°C bei permanentem Mischen) wurde bei erfindungsgemäßen Mikropartikel eine Blutung von < 240 ng/mg gemessen. Die Bindekapazität der beladenen Mikropartikel wird in Nanogramm (gebundenes ¹⁴C-Biotin) pro Milligramm (Mikropartikel) angegeben. Bevorzugt beträgt die Bindekapazität > 250 ng/mg, stärker bevorzugt > 400 ng/mg, noch stärker bevorzugt > 500 ng/mg. Die Bindekapazität kann bis zu 1000 ng/mg betragen. Der bevorzugte Bereich liegt bei 400 bis 600 ng/mg. Bei Verwendung von größerem SA-Poly bis zu 200 nm sind mit dem erfindungsgemäßen Verfahren noch höhere Werte erreichbar.

Das folgende Beispiel erläutert die Erfindung weiter.

Beispiel

Herstellung von Streptavidin-beladenen Beads

Streptavidin (Roche Diagnostics) wurde in einer Konzentration von 2 mg/ml in 50 mM K₂HPO₄, pH 7,0 zu einer 1%igen Beadsuspension von unbeladenen Mikropartikeln (Uncoated Beads M-270, Fa. Dynal) bei 20°C hinzugegeben. Anschließend wurde die erhaltene Suspension über einen Zeitraum von 40 Minuten auf 50°C erwärmt und für 10 Stunden bei dieser Temperatur gehalten. Danach wurde die Suspension wieder auf 20°C abgekühlt. Im Anschluß daran wurde nicht gebundenes Streptavidin durch Filtration durch eine Membran mit einem Porendurchmesser von 0,45 µm gegen 5 Volumen des Beladepuffers entfernt. Zur Fixierung des gebundenen Streptavidins wurde die 1%ige Suspension mit UV-Licht bestrahlt. Die Streptavidinbeads wurden anschließend mit 10 Volumen 50 mM K₂HPO₄, pH 7,0 gewaschen. Das Material wurde nach Zugabe eines Biozids bei 4°C gelagert.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von proteinbeladenen Mikropartikeln umfassend die Schritte
 - (a) Inkontaktbringen von Mikropartikeln mit Proteinmaterial in einer Suspension,
 - (b) gleichmäßiges Erwärmen der Suspension auf 25 bis 70°C über einen Zeitraum von 10 bis 90 min.
 - (c) Aufrechterhalten der in (b) erreichten Temperatur über einen Zeitraum von 0 bis 50 h,
 - (d) Bestrahlen der Suspension mit UV-Licht in Abwesenheit eines Photolinkers.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß eine Mikropartikel-Suspension von unter 20% Gewicht pro Volumen verwendet wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Mikropartikel eine hydrophobe Oberfläche aufweisen.
4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Mikropartikel eine Größe von 50 nm bis 25 µm haben.
5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Mikropartikel aus Polystyrol-Latex bestehen und gegebenenfalls Magnetit enthalten.

6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das Proteinmaterial eine hydrophobe Oberfläche aufweist.
7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß das Proteinmaterial eine Größe von 20 nm bis 0,3 µm hat.
8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß das Proteinmaterial polymerisiertes Streptavidin ist.
9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß eine Sedimentation der Mikropartikel vermieden wird.
10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Sedimentation durch Rühren, Umpumpen, Einleitung von Dispergierenergie oder jedwede Kombination solcher Maßnahmen oder durch andere geeignete physikalische Methoden verhindert wird.
11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß vor und/oder nach der Bestrahlung mit UV-Licht eine Abtrennung von nicht oder nur schwach adsorbiertem Proteinmaterial erfolgt.
12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß mehrere aufeinanderfolgende Abtrennungsschritte durchgeführt werden.
13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß nach jedem Abtrennungsschritt der Puffer gewechselt wird.
14. Verfahren nach Anspruch 11, 12 oder 13, dadurch gekennzeichnet, daß die Abtrennung durch Membranfiltration erfolgt.
15. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß eine Membran mit einem Porendurchmesser von 0,4 µm bis 2,5 µm verwendet wird.
16. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Wellenlänge des verwendeten UV-Lichts mindestens 340 nm beträgt.
17. Protein-beladene Mikropartikel, dadurch gekennzeichnet, daß sie durch das Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche erhältlich sind und daß sie eine geringere Blutungsneigung aufweisen als nach herkömmlichen Methoden der adsorptiven Kopplung hergestellte Protein-beladene Mikropartikel.
18. Protein-beladene Mikropartikel nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß das Protein SA-Poly ist und die Bindekapazität der SA-polybeladenen Partikel ≥ 250 ng/mg (Biotin/Partikel) und die Blutungsneigung < 80 ng/mg bei Raumtemperatur beträgt.
19. Vorrichtung zur Anwendung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 16, umfassend mindestens je eins der folgenden Module, die miteinander durch Leitungen verbunden sind
 - (a) Beladereaktor (1), welcher mit einem Heizmantel (11) und einer Rührvorrichtung (10) ausgerüstet ist,
 - (b) Belichtungsmodul (2), welches aus einem äußeren, für UV-Lichtdurchlässigen Rohr (12) und einem unbefestigten inneren Körper (13) mit einem kleinerem Durchmesser als der Innendurchmesser des äußeren Rohres (12) aufgebaut ist, so daß die Partikelsuspension durch den rohrförmigen Spalt (15) zwischen dem äußeren Rohr (12) und dem inneren Körper (13) geleitet wird und den inneren Körper freischwimmend hält, und wobei das äußere Rohr von einer UV-Lichtquelle (14) umgeben ist.
20. Vorrichtung nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet,

zeichnet, daß sie weiterhin folgende Module umfaßt:

(c) Abtrennmodul (3), welches aus einer Mikrofiltrationseinheit aus Membranen besteht,

(d) Abfüllmodul (4),

wobei alle Module so beschaffen sind, daß eine Sedimentation der Partikelsuspension vermieden wird. 5

21. Vorrichtung nach Anspruch 19 oder 20, dadurch gekennzeichnet, daß alle Module während des laufenden Betriebes einzeln sterilisierbar sind.

22. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 19 bis 21, 10 dadurch gekennzeichnet, daß sie ein geschlossenes System darstellt.

Hierzu 2 Seite(n) Zeichnungen

15

20

25

30

35

40

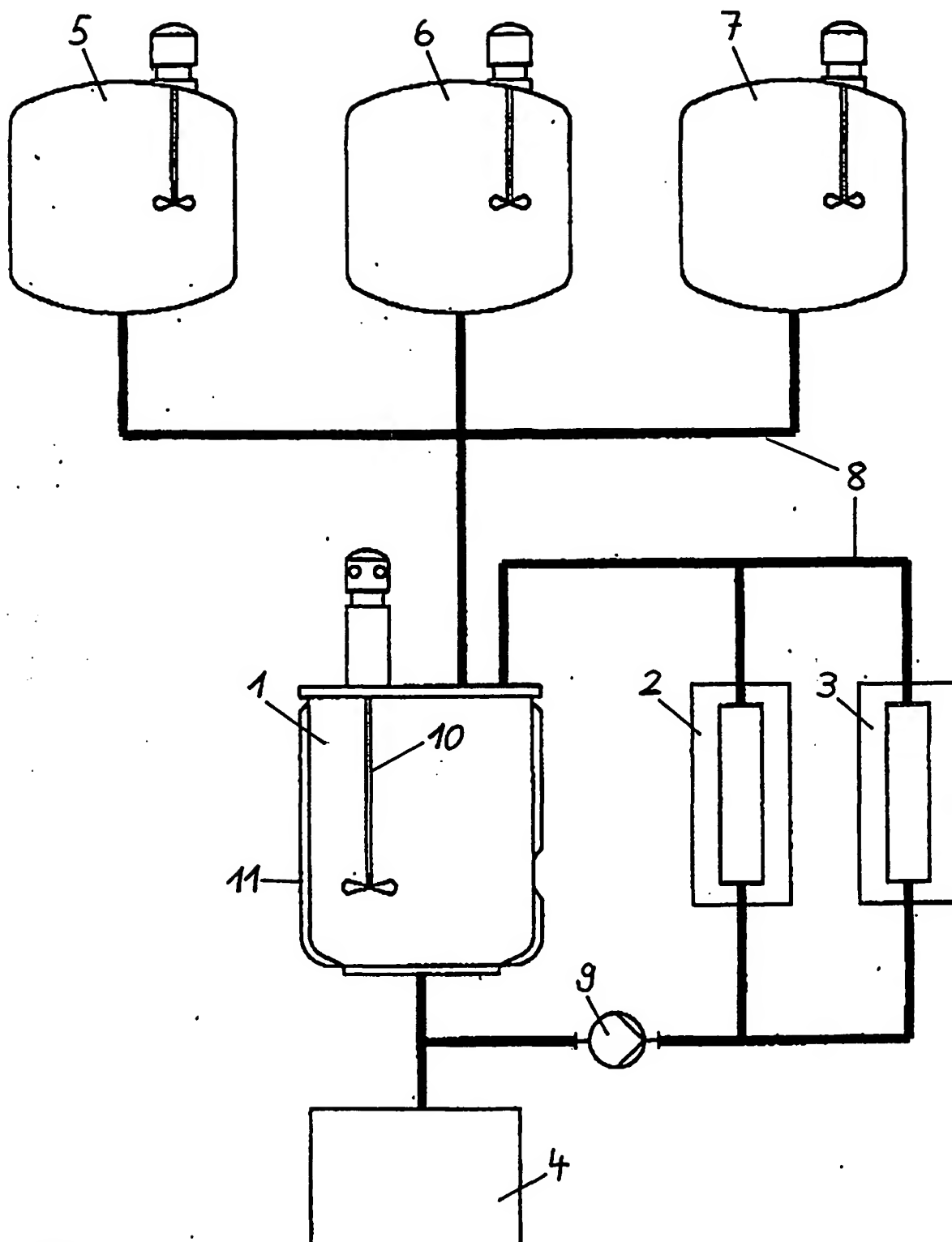
45

50

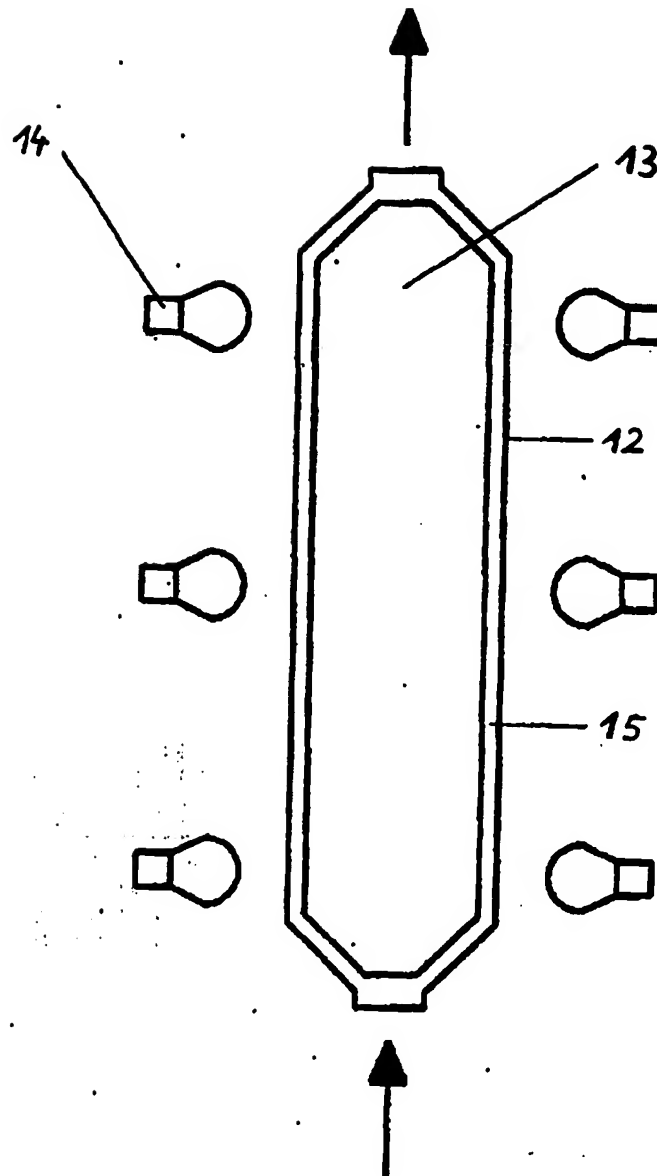
55

60

65



Figur 1



Figur 2